

半枝莲总黄酮中7种成分的含量测定及抗肿瘤活性

田新宇^{1,2}, 范翠梅^{1,2}, 渠田田^{1,2}, 朱恩圆^{1,2*}, 季莉莉¹, 俞桂新^{1,2}

(1. 上海中医药大学 中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203;
2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203)

[摘要] **目的:**建立半枝莲总黄酮中7种成分的含量测定方法,并对半枝莲总黄酮及7种成分进行体外抗肿瘤活性的评价。**方法:**采用HPLC方法,测定半枝莲总黄酮中7种成分野黄芩苷,芹菜素-5-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷,野黄芩素,异高山黄芩素-8-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷,木犀草素,4'-羟基汉黄芩素及芹菜素的含量。采用噻唑蓝(MTT)法评价半枝莲总黄酮及7种化学成分分别对人肝癌细胞(Hep3B),人胃癌细胞(AGS),人肺癌细胞(A549),小鼠黑色素瘤细胞(B16),小鼠乳腺癌细胞(4T1)5种癌细胞存活率的影响。**结果:**建立了测定半枝莲总黄酮中7种成分野黄芩苷,芹菜素-5-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷,野黄芩素,异高山黄芩素-8-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷,木犀草素,4'-羟基汉黄芩素及芹菜素含量测定方法,线性范围分别为9.98~249.60, 1.06~26.50, 2.16~54.00, 2.56~64.05, 1.16~29.10, 0.52~13.00, 1.18~29.50 mg·L⁻¹;平均加样回收率分别为103.47%, 96.15%, 98.66%, 98.91%, 98.25%, 102.67%, 102.32%, RSD分别为2.1%, 1.1%, 1.7%, 3.2%, 2.1%, 1.8%, 1.9%。半枝莲总黄酮(300 mg·L⁻¹)对Hep3B, AGS, A549及B16共4种肿瘤细胞的增殖抑制率均>50%。木犀草素和4'-羟基汉黄芩素抑制肿瘤细胞生长的活性较显著,木犀草素的半数抑制浓度(IC₅₀)为26.64~36.97 mmol·L⁻¹, 4'-羟基汉黄芩素的IC₅₀为20.14~37.91 mmol·L⁻¹。**结论:**该方法专属性强,准确度高,重复性好,可用于半枝莲总黄酮中多种有效成分的含量测定。半枝莲总黄酮对Hep3B, AGS, A549, B16及4T1肿瘤细胞的增殖均有一定的抑制作用,木犀草素和4'-羟基汉黄芩素对该5种细胞增殖抑制活性显著,推测半枝莲总黄酮是半枝莲抗肿瘤的主要活性部位,而木犀草素和4'-羟基汉黄芩素是其主要活性成分。

[关键词] 半枝莲; 总黄酮; 肿瘤细胞生长

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)01-0053-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017010053

Determination of Seven Compounds and Antitumor Activity of Total Flavonoids from Scutellariae Barbatae Herba

TIAN Xin-yu^{1,2}, FAN Cui-mei^{1,2}, QU Tian-tian^{1,2}, ZHU En-yuan^{1,2*}, JI Li-li¹, CHOU Gui-xin^{1,2}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China;
2. Shanghai R&D Center for Standardization of TCM, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for detecting the contents of seven compounds in total flavonoids from Scutellariae Barbatae Herba, and further study the antitumor activity of total flavonoids and seven compounds from Scutellariae Barbatae Herba. **Method:** The contents of scutellarin, apigenin-5-*O*- β -D-glucopyranoside, scutellarein, isoscutellarein 8-glucuronide, luteolin, 4'-hydroxywogonin, and apigenin were detected by HPLC. The antitumor activity of total flavonoids and the seven compounds were assayed in human hepatocellular carcinoma cells (Hep3B), human gastric cancer cells (AGS), human lung cancer cells (A549), mouse melanoma cells (B16) and mouse breast cancer cells (4T1) by using MTT assay. **Result:** The HPLC

[收稿日期] 20160222(022)

[基金项目] 中医药行业科研专项(201307002)

[第一作者] 田新宇,在读硕士,从事中药化学成分和质量标准研究, Tel:15201917035, E-mail:txyu90@yeah.net

[通讯作者] *朱恩圆,研究员,硕士生导师,从事中药化学成分和质量标准研究, Tel:13918298547, E-mail:wzxy@163.com

method was established to detect the contents of above seven compounds. The linear range was 9.98-249.60, 1.06-26.50, 2.16-54.00, 2.56-64.05, 1.16-29.10, 0.52-13.00 and 1.18-29.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively for the above 7 components, with an average recovery rate of 103.47%, 96.15%, 98.66%, 98.91%, 98.25%, 102.67% and 102.32% respectively, and RSD of 2.1%, 1.1%, 1.7%, 3.2%, 2.1%, 1.8%, and 1.9%. The total flavonoids ($300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) showed obvious inhibitory effect on the proliferation of Hep3B, AGS, A549 and B16 cells (the inhibitory rate was $> 50\%$ for the 4 kinds of cells). Luteolin and 4'-hydroxywogonin showed significant anti-tumor activity (IC_{50} 26.64-36.97 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and 20.14-36.97 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively).

Conclusion: The method is simple, rapid, accurate and is suitable for the determination of effective compounds in total flavonoids from *Scutellariae Barbatae Herba*. The total flavonoids have certain inhibitory effect, while luteolin and 4'-hydroxywogonin have significant inhibitory effect on the proliferation of Hep3B, AGS, A549, B16 and 4T1 cells. All these results indicated that the total flavonoids are the main active fraction in *Scutellariae Barbatae Herba* for anti-tumor effect, and luteolin and 4'-hydroxywogonin are the main active ingredient.

[**Key words**] *Scutellariae Barbatae Herba*; total flavonoids; tumor cell growth

半枝莲具有清热解毒、化痰利尿的功效^[1]。现代药理学研究表明半枝莲的抗肿瘤活性显著^[2-3], 临床多单用或者与其他药组成复方, 治疗原发性肝癌、消化道肿瘤、肺癌及乳腺癌等疾病。半枝莲的主要活性成分有黄酮类和二萜类化合物^[4], 其中野黄芩苷、木犀草素、芹菜素等黄酮含量较高, 二萜类成分含量普遍偏低。此外, 还有生物碱、有机酸、多糖及挥发油等成分。已有研究表明半枝莲总黄酮主要通过抑制肿瘤血管生成、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤生长与增殖等途径发挥抗肿瘤作用^[5-6]。笔者在前期的半枝莲化学成分研究中成功的分离得到野黄芩苷, 芹菜素-5-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷, 芹菜素, 异高山黄芩素-8-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷, 木犀草素, 4'-羟基汉黄芩素及芹菜素等主要的黄酮类成分。此外, 笔者通过将半枝莲的 70% 乙醇提取液通过 D101 型大孔树脂富集得到了半枝莲总黄酮提取物。

现行 2015 年版《中国药典》规定了半枝莲药材中总黄酮和野黄芩苷 ($\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$) 的含量限度, 目前很多学者通过 HPLC, HPLC-MS 及 HPLC-MS/MS 等技术对半枝莲的多种黄酮类成分进行定量分析^[7-8], 但未见以半枝莲的主要活性部位总黄酮为研究对象, 对其进行多种成分定量分析。本实验建立了半枝莲总黄酮中 7 种成分的 HPLC 含量测定方法, 并在细胞水平研究了半枝莲总黄酮及其所含 7 种主要成分对不同的肿瘤细胞生长的抑制作用。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪 (包括 1311A 型四元泵, 1322A 型在线真空脱气机, 1367B 型自动进样器, 1316A 型柱恒温箱, 1315D 型 DAD 检测器,

Agilent 公司), BSA 124S-CW 型 1/1 万电子分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司), BT 25S 型电子分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司), KQ-250DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司), CO_2 型恒温培养箱 (美国 Thermo 公司), Power Wave XS 型酶标仪 (Bio-Tek Instruments)。

半枝莲药材收集于湖北、广西、安徽及河南等省, 经上海中医药大学中药标准化研究中心吴立宏研究员鉴定为唇形科植物半枝莲 *Scutellaria barbata* 的干燥全草, 来源信息见表 1。半枝莲总黄酮提取物为本实验自制 (半枝莲的 70% 乙醇提取液通过 D101 型大孔树脂柱富集得到, 采用不同批次半枝莲共制备 9 批半枝莲总黄酮提取物)。乙腈、甲醇、乙酸、磷酸均为色谱纯, Milli-Q 纯净水, SDS (十二烷基硫酸钠) 等其他试剂均为分析纯。对照品野黄芩

表 1 半枝莲药材来源

Table 1 Resources of *Scutellariae Barbatae Herba*

No.	批号	产地	收集地
1	bzl140602	河南	亳州市京皖中药饮片厂
2	bzl140710	安徽	安徽无为县国泰大药房
3	B409101	河北	河北楚风中药饮片有限公司
4	bzl140727	湖北	河南辉县市医药有限公司
5	bzl140729	广西	河南省医药超市有限公司
6	bzl1408131	河南	安国市冀光中药材有限公司
7	bzl140701	湖北	湖北
8	bzl1407261	湖北	广西玉林中药材市场
9	bzl1407262	河南	广西玉林中药材市场

苷, 芹菜素-5-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷, 野黄芩素, 异高山黄芩素-8-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷, 木犀草素, 4'-羟基汉黄芩素及芹菜素均为本实验室自制, 经核磁分析确认其结构, HPLC 面积归一法测定其纯度 > 98%。RPMI-1640 培养基, 高糖 DMEM 培养基, 胎牛血清 (Gibco 公司), MTT (Sigma 公司)。人肝癌细胞 (Hep3B), 人胃癌细胞 (AGS), 人肺癌细胞 (A549), 小鼠黑色素瘤细胞 (B16) 及小鼠乳腺癌细胞 (4T1) 5 种细胞株购自 The American Type Culture Collection (ATCC)。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 取野黄芩苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成质量浓度为 $0.1944 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品溶液, 作为储备液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取半枝莲总黄酮提取物 (批次 1) 约 250 mg, 精密称定, 加甲醇超声溶解, 定容于 100 mL 量瓶中, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

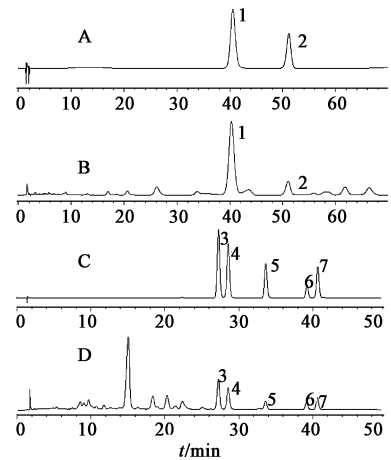
2.1.3 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL 分别于 25 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度线, 摇匀, 以甲醇溶液为空白对照, 在 335 nm 处分别测定其吸光度。以吸光度为纵坐标, 浓度 (C) 为横坐标, 进行线性回归得标准曲线方程为 $Y = 28.214X + 6.2855 (r = 0.9999)$, 结果表明样品溶液在 $0.0031 \sim 0.0156 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度有良好的线性关系。

2.1.4 半枝莲总黄酮提取物中总黄酮的含量测定 按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.2 项下的标准曲线制备方法测定在 335 nm 波长处的吸光度, 并由标准曲线计算出浓度, 测定半枝莲总黄酮提取物 (批次 1) 中含总黄酮以野黄芩苷计为 32.99%。

2.2 7 种化学成分的含量测定

2.2.1 色谱条件和系统适应性试验 Fortis C_{18} 色谱柱 (4.0 mm \times 150 mm, 5 μm)。野黄芩苷和芹菜素-5-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷流动相乙腈-1% 乙酸水溶液, 梯度洗脱 (0 ~ 42 min, 13% 乙腈; 42 ~ 52 min, 13% ~ 15% 乙腈); 野黄芩素, 异高山黄芩素-8-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷, 木犀草素, 4'-羟基汉黄芩素及芹菜素流动相甲醇-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 35% ~ 45% 甲醇; 20 ~ 45 min, 45% ~ 60% 甲醇), 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 335 nm, 柱温

30 $^{\circ}\text{C}$, 色谱见图 1。



A, C. 对照品; B, D. 供试品; 1. 野黄芩苷; 2. 芹菜素-5-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷; 3. 野黄芩素; 4. 异高山黄芩素-8-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷; 5. 木犀草素; 6. 4'-羟基汉黄芩素; 7. 芹菜素

图 1 半枝莲总黄酮提取物的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of total flavonoids from *Scutellariae Barbatae Herba*

2.2.2 对照品溶液制备 取野黄芩苷、芹菜素-5-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成质量浓度为 $0.4992, 0.0530 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 作为储备液。取野黄芩素、异高山黄芩素-8-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷, 木犀草素, 4'-羟基汉黄芩素及芹菜素对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成质量浓度为 $0.1080, 0.1281, 0.0582, 0.0260, 0.0590 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 作为储备液。

2.2.3 供试品溶液制备 取半枝莲总黄酮样品约 0.25 g, 精密称定, 加 70% 乙醇溶液超声溶解, 定容置 50 mL 量瓶中, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取野黄芩苷、芹菜素-5-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷对照品适量, 依次用甲醇稀释成野黄芩苷质量浓度为 9.98, 49.92, 99.84, 149.76, 199.68, 249.60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 芹菜素-5-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷质量浓度为 1.06, 5.30, 10.60, 15.90, 21.20, 26.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列混合对照品溶液, 精密吸取 10 μL 注入色谱仪进行测定。

分别精密吸取野黄芩素, 异高山黄芩素-8-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷, 木犀草素, 4'-羟基汉黄芩素和芹菜素对照品适量, 依次用甲醇稀释成野黄芩素为 2.16, 10.80, 21.60, 32.40, 43.20, 54.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 异高山黄芩素-8-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷质量浓度为 2.56, 12.81, 25.62, 38.43, 51.24, 64.05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;

木犀草素质量浓度为 1.16, 5.82, 11.64, 17.46, 23.28, 29.10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 4'-羟基汉黄芩素质量浓度为 0.52, 2.60, 5.20, 7.80, 10.40, 13.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 芹菜素质量浓度为 1.18, 5.90, 11.80, 17.70, 23.60, 29.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列混合对照品溶液, 吸取 10 μL 注入色谱仪进行测定。

以对照品溶液的进样浓度 (X) 为横坐标, 峰面积积分值 (Y) 为纵坐标, 进行线性回归得标准曲线方程分别为野黄芩苷 $Y = 28\,214X + 6.285\,5$ ($r = 0.999\,9$); 芹菜素-5- O - β - D -吡喃葡萄糖苷 $Y = 25\,178X - 6.046\,5$ ($r = 0.999\,8$); 野黄芩素 $Y = 38\,187X - 52.141$ ($r = 0.999\,8$); 异高山黄芩素-8- O - β - D -葡萄糖醛酸苷 $Y = 23\,934X - 3.468\,5$ ($r = 0.999\,9$); 木犀草素 $Y = 32\,345X - 2.567\,4$ ($r = 0.999\,9$); 4'-羟基汉黄芩素 $Y = 25\,649X - 1.828\,3$ ($r = 0.999\,9$); 芹菜素 $Y = 27\,993X - 2.144\,9$ ($r = 0.999\,9$)。结果表明野黄芩苷在 9.98 ~ 249.60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 芹菜素-5- O - β - D -吡喃葡萄糖苷在 1.06 ~ 26.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 野黄芩素在 2.16 ~ 54.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 异高山黄芩素-8- O - β - D -葡萄糖醛酸苷在 2.56 ~ 64.05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 木犀草素在 1.16 ~ 29.10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 4'-羟基汉黄芩素在 0.52 ~ 13.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 芹菜素在 1.18 ~ 29.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 取野黄芩苷、芹菜素-5- O - β - D -吡喃葡萄糖苷质量浓度分别为 49.92, 5.30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 同一天内连续进样 6 次, 分别测得峰面积的 RSD 分别为 0.7% 和 1.7%。结果表明日内精密度良好。分别连续 3 d 进行测试, 测得峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 2.7%, 结果表明日间精密度良好。

取野黄芩素、异高山黄芩素-8- O - β - D -葡萄糖醛酸苷, 木犀草素, 4'-羟基汉黄芩素和芹菜素质量浓度分别为 21.60, 25.62, 11.64, 5.20, 11.80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 同一天内连续进样 6 次, 测得峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.23%, 0.4%, 0.3%, 0.6%, 表明日内精密度良好。分别连续 3 d 进行测试, 测得峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 0.6%, 0.6%, 0.5%, 1.7%, 结果表明日间精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取样品粉末约 0.25 g, 共 6 份, 精密称定, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件, 测定野黄芩苷, 芹菜素-5- O - β - D -吡喃葡萄糖苷, 野黄芩素, 异高山黄芩素-8- O - β - D -葡萄糖醛酸苷, 木犀草素, 4'-羟基汉黄芩素和芹菜素的质量分数分别为 68.49, 13.87, 21.29, 22.89, 6.03, 6.39, 10.01 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为

1.5%, 1.0%, 1.3%, 0.4%, 0.9%, 1.8%, 1.0%, 说明方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 各进样 10 μL , 结果野黄芩苷, 芹菜素-5- O - β - D -吡喃葡萄糖苷, 野黄芩素, 异高山黄芩素-8- O - β - D -葡萄糖醛酸苷, 木犀草素, 4'-羟基汉黄芩素和芹菜素峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 1.8%, 0.4%, 0.4%, 0.3%, 0.1%, 1.6%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 加样回收试验 取已知含量的样品粉末 9 份, 约 0.125 g, 精密称定, 分别按已知含量的 50%, 100%, 150% 共 3 个水平加入对照品溶液, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件, 测定野黄芩苷, 芹菜素-5- O - β - D -吡喃葡萄糖苷, 野黄芩素, 异高山黄芩素-8- O - β - D -葡萄糖醛酸苷, 木犀草素, 4'-羟基汉黄芩素和芹菜素的含量, 计算加样回收率。结果表明, 7 个成分的加样回收率都在 95% ~ 105%, 野黄芩苷, 芹菜素-5- O - β - D -吡喃葡萄糖苷, 野黄芩素, 异高山黄芩素-8- O - β - D -葡萄糖醛酸苷, 木犀草素, 4'-羟基汉黄芩素和芹菜素的平均回收率分别为 103.47%, 96.15%, 98.66%, 98.91%, 98.25%, 102.67%, 102.32%, RSD 分别为 2.1%, 1.1%, 1.7%, 3.2%, 2.1%, 1.8%, 1.9%。见表 2。

2.2.9 样品含量测定 取不同批次的半枝莲总黄酮提取物的干燥粉末, 分别按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件, 测定峰面积, 结果见表 3。

3 体外抗肿瘤活性研究

3.1 细胞培养 人肝癌细胞 (Hep3B) 培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 人胃癌细胞 (AGS), 人肺癌细胞 (A549), 小鼠黑色素瘤细胞 (B16), 小鼠乳腺癌细胞 (4T1) 均培养于含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液。5 种细胞均放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 湿度饱和的二氧化碳培养箱中培养。

3.2 MTT 实验 取对数生长期细胞并调整细胞悬液密度为 5×10^4 个/mL, 以每孔 100 μL 铺入 96 孔板中, 用相应的培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 中培养。待细胞贴壁后加入一定浓度的待测药物 (对照组加入含 0.1% DMSO 的培养基), 与细胞共孵育 48 h 后, 每孔加入 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 10 μL , 置培养基反应 4 h 后, 每孔加入三联剂 (10% SDS-5% 异丁醇-0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl) 50 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中充分溶解 12 h 以上, 用酶标仪读取 570/630 nm 处吸光度 A 。药物对细胞抑制率的影响, 按下述公式计算。

表 2 7 个黄酮成分的加样回收试验

Table 2 Result of recovery tests in Scutellariae Barbatae Herba

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%
野黄芩苷	0.125 1	8.568	4.813	13.331	98.97
	0.125 0	8.561	8.750	17.748	104.99
	0.125 5	8.596	13.125	21.845	100.95
芹菜素-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	0.125 1	1.683	0.805	2.455	95.85
	0.125 0	1.682	1.610	3.225	95.86
野黄芩素	0.125 5	1.689	2.576	4.170	96.33
	0.125 0	2.660	1.458	4.120	100.12
异高山黄芩素-8-O-β-D-葡萄糖醛酸苷	0.125 5	2.671	2.650	5.332	100.42
	0.125 5	2.671	3.975	6.495	96.21
	0.125 0	2.856	1.295	4.156	100.26
木犀草素	0.125 5	2.869	2.590	5.410	98.13
	0.125 5	2.869	3.885	6.596	95.93
4'-羟基汉黄芩素	0.125 0	0.755	0.370	1.127	100.63
	0.125 5	0.758	0.740	1.481	97.64
	0.125 5	0.758	1.110	1.819	95.59
芹菜素	0.125 0	0.797	0.425	1.240	104.22
	0.125 5	0.800	0.850	1.666	101.85
	0.125 5	0.800	1.275	2.062	98.94
野黄芩素	0.125 0	1.247	0.634	1.907	104.2
	0.125 5	1.252	1.268	2.570	103.97
	0.125 5	1.252	1.902	3.214	103.17

$$\text{抑制率} = [1 - \text{给药组}(A_{570} - A_{630}) / \text{对照组}(A_{570} - A_{630})] \times 100\%$$

3.3 统计分析 所有数据资料均用 SPSS 18.0 统计软件分析,用 One-way ANOVA 进行处理,各组数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

表 4 半枝莲总黄酮对 5 种癌细胞增值的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 4 Inhibitory effect of total flavonoids on cell proliferation of five tumor cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	Hep3B	AGS	A549	B16	4T1
空白	0	-	-	-	-	-
总黄酮	50	8.66 ± 2.89 ²⁾	7.15 ± 2.75	19.86 ± 1.94 ²⁾	6.21 ± 2.10	6.68 ± 4.97
	100	44.43 ± 0.61 ²⁾	16.90 ± 5.81 ¹⁾	27.23 ± 6.43 ²⁾	20.85 ± 5.12 ²⁾	8.87 ± 3.65 ¹⁾
	200	67.61 ± 0.81 ²⁾	55.7 ± 5.81 ²⁾	44.74 ± 3.64 ²⁾	38.24 ± 11.55 ²⁾	31.05 ± 0.53 ²⁾
	300	64.90 ± 1.08 ²⁾	59.12 ± 7.73 ²⁾	63.32 ± 1.16 ²⁾	64.72 ± 5.34 ²⁾	46.07 ± 1.30 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

半枝莲是传统的清热解毒类中药,临床上常用

表 3 半枝莲总黄酮样品中 7 种成分的含量测定

Table 3 Seven compounds of total flavonoids from Scutellariae Barbatae Herba

No.	野黄芩苷	芹菜素-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	野黄芩素	异高山黄芩素-8-O-β-D-葡萄糖醛酸苷	木犀草素	4'-羟基汉黄芩素	芹菜素
1	68.50	13.88	21.31	22.89	6.05	6.38	9.98
2	69.96	13.29	18.55	21.51	5.72	6.02	9.30
3	79.34	11.06	19.11	23.25	5.81	5.83	9.73
4	74.86	9.21	17.76	19.13	7.57	4.97	12.57
5	68.59	10.12	18.79	20.16	6.55	5.40	10.85
6	70.10	10.19	18.06	21.44	5.72	6.13	9.64
7	72.27	12.02	20.04	22.94	5.91	5.96	9.93
8	72.85	11.29	14.68	20.38	4.87	4.53	8.25
9	75.81	12.81	18.68	22.74	5.75	5.70	9.67

3.4 结果 质量浓度为 100 mg·L⁻¹ 的半枝莲总黄酮提取物(批次 1),浓度为 100 mmol·L⁻¹ 的野黄芩苷,芹菜素-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷,野黄芩素,异高山黄芩素-8-O-β-D-葡萄糖醛酸苷,木犀草素,4'-羟基汉黄芩素及芹菜素对 5 种癌细胞的细胞活力均有一定的抑制作用,其中木犀草素,4'-羟基汉黄芩素及芹菜素 3 种单体具有显著的抑制作用见表 4,5。分别对这 3 种单体抑制肿瘤细胞生长活性进行了 IC₅₀ 检测,木犀草素对 5 种肿瘤细胞生长抑制的 IC₅₀ 在 26.64 ~ 36.97 mmol·L⁻¹,4'-羟基汉黄芩素对 5 种肿瘤细胞生长抑制的 IC₅₀ 在 20.14 ~ 37.91 mmol·L⁻¹。芹菜素除了在 Hep3B 上 IC₅₀ 为 32.27 μmol·L⁻¹,对其他细胞的 IC₅₀ 均 > 100 μmol·L⁻¹,见表 6。

于治疗胃癌、食道癌、直肠癌等消化道肿瘤,对乳腺癌、肝癌也有较好的疗效。本实验将半枝莲总黄酮

表 5 7 种化学成分 (100 mmol·L⁻¹) 对 5 种癌细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

成分	Hep3B	AGS	B16	A549	4T1	%
野黄芩苷	25.19 ± 2.18	34.00 ± 1.64	16.5 ± 1.64	13.93 ± 0.29	0.69 ± 0.51	
芹菜素-5- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	31.88 ± 4.30	54.21 ± 3.49	57.00 ± 0.16	20.75 ± 3.46	44.47 ± 3.14	
野黄芩素	25.92 ± 1.92	34.88 ± 2.37	10.83 ± 0.72	24.92 ± 1.53	4.63 ± 0.18	
异高山黄芩素-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖醛酸苷	41.21 ± 0.41	14.00 ± 3.80	10.19 ± 1.56	4.03 ± 0.47	0.21 ± 3.74	
木犀草素	72.84 ± 0.39	77.15 ± 1.43	88.61 ± 0.58	67.83 ± 5.42	86.22 ± 0.40	
4'-羟基汉黄芩素	78.98 ± 0.29	77.52 ± 2.09	75.93 ± 1.53	70.92 ± 5.14	90.27 ± 4.01	
芹菜素	72.50 ± 0.67	49.40 ± 4.76	36.29 ± 2.26	46.73 ± 1.59	16.01 ± 2.17	

表 6 木犀草素, 4'-OH-汉黄芩素, 芹菜素对 5 种癌细胞的 IC₅₀ ($\bar{x} \pm s, n=3$)

成分	Hep3B	AGS	B16	A549	4T1	μmol·L ⁻¹
木犀草素	35.89 ± 13.42	26.64 ± 0.81	30.63 ± 9.08	36.59 ± 8.78	36.97 ± 4.50	
4'-羟基汉黄芩素	24.48 ± 6.63	20.14 ± 3.38	27.72 ± 5.49	28.51 ± 0.17	37.91 ± 7.17	
芹菜素	32.27 ± 1.64	>100	>100	>100	>100	

提取物分别作用于 Hep3B, AGS, A549, B16, 4T1, 用 MTT 法检测以上 5 种癌细胞的生长情况, 结果表明半枝莲总黄酮提取物能有效抑制多种肿瘤细胞的生长和增殖, 并在一定范围内与剂量呈正相关, 当质量浓度为 300 mg·L⁻¹ 时, 总黄酮对 Hep3B, AGS, A549 及 B16 4 种细胞的增殖抑制率 > 50%, 推测总黄酮提取物是半枝莲抗肿瘤的主要活性部位。其次, 考察了半枝莲总黄酮中 7 种化学成分的体外抑癌活性, 结果表明该 7 种成分均有一定的活性, 其中木犀草素和 4'-羟基汉黄芩素 2 种单体对 5 种癌细胞均有较好的抑制作用木犀草素 (26.64 ~ 36.97 mmol·L⁻¹), 4'-羟基汉黄芩素 (20.14 ~ 37.91 mmol·L⁻¹)。半枝莲总黄酮样品 (批次 1) 中 7 种化学成分的含量为野黄芩苷 > 异高山黄芩素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷 > 野黄芩素 > 芹菜素-5-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷 > 芹菜素 > 4'-羟基汉黄芩素 > 木犀草素, 各成分总含量占总黄酮含量的 45.24%。研究表明野黄芩苷可以有效抑制舌鳞状细胞癌的增殖^[9], 同时可以作为化疗增敏剂^[10], 木犀草素和芹菜素均具有一定的抗癌活性, 而其他 4 种单体的抗癌活性研究较少。在本研究中, 4'-羟基汉黄芩素对 5 种癌细胞增殖均表现出较显著的抑制活性, 推测该单体是半枝莲抗肿瘤的有效成分之一, 可以作为质量控制指标。本实验初步评价了半枝莲的总黄酮和主要黄酮类成分的抗癌活性, 为揭示半枝莲抗肿瘤作用及其物质基础以及抗肿瘤中药的开发提供了实验依据。

此外, HPLC 色谱条件建立过程中, 曾尝试采用

同一流动相系统同时分离测定野黄芩苷, 芹菜素-5-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷, 野黄芩素, 异高山黄芩素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷, 木犀草素, 4'-羟基汉黄芩素及芹菜素等 7 种成分, 结果均不太理想, 其中野黄芩苷含多个酚羟基和羧基, 其色谱行为受到 pH 的影响, 笔者尝试了不同酸和 pH 的酸性流动相, 结果显示在高比例的乙酸系统, 野黄芩苷可以呈现很好的分离度和对称性。因此, 本实验采用了 2 种流动相系统对以上成分进行含量测定。结果表明, 9 批半枝莲总黄酮样品中 7 种成分的平均质量分数分别为 72.48, 11.54, 18.55, 21.60, 5.99, 5.66, 9.99 mg·g⁻¹。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 70.

[2] LIN J, CHEN Y, CAI Q, et al. *Scutellaria barbata* D. Don inhibits colorectal cancer growth via suppression of multiple signaling pathways[J]. *I Cancer Ther*, 2014, 13(3): 240-248.

[3] GONG T, WANG C F, YUAN J R, et al. Inhibition of tumor growth and immunomodulatory effects of flavonoids and scutebarbatines of *Scutellaria barbata* D. Don in lewis-bearing C57BL/6 mice [J]. *Evidence-Based Comple Altern Med*, 2015, 2015: 630760-630771.

[4] 李园园. 半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 化学成分及生物活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.

[5] DAI Z J, LU W F, GAO J, et al. Anti-angiogenic effect of the total flavonoids in *Scutellaria barbata* D. Don[J].

- BMC Comple Altern Med, 2013, 13(1): 442-448.
- [6] GAO J, LU W F, DAI Z J, et al. Induction of apoptosis by total flavonoids from *Scutellaria barbata* D. Don in human hepatocarcinoma MHCC97-H cells via the mitochondrial pathway [J]. Tumor Biology, 2014, 35 (3): 2549-2559
- [7] 乔春峰, 韩全斌, 宋景政, 等. RP-HPLC 测定半枝莲药材中 4 种主要黄酮类成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(17): 1342-1344.
- [8] QIAO S, SHI R, LIU M, et al. Simultaneous quantification of flavonoids and phenolic acids in Herba *Scutellariae Barbatae* and its confused plants by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2011, 129 (3): 1297-1304.
- [9] LI H, HUANG D, GAO Z, et al. Scutellarin inhibits the growth and invasion of human tongue squamous carcinoma through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and-9 and $\alpha v \beta 6$ integrin [J]. Int J Oncol, 2013, 42(5): 1674-1681.
- [10] Chan J Y, Tan B K H, Lee S C. Scutellarin sensitizes drug-evoked colon cancer cell apoptosis through enhanced caspase-6 activation [J]. Anticancer Research, 2009, 29(8): 3043-3047.
- [责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》2014—2016 年度优秀审稿专家名单

田元祥教授(中国中医科学院中医临床基础医学研究所)
刘春生教授(北京中医药大学)
沈祥春教授(贵阳医学院药学院)
王长虹教授(上海中医药大学)
倪艳教授(山西省中医药研究院)
倪健教授(北京中医药大学)
赵艳玲研究员(解放军 302 医院)
李孝栋教授(福建中医药大学)
康文艺教授(河南大学)
张艳教授(辽宁中医药大学)
任钧国研究员(中国中医科学院西苑医院)
蔡宇教授(暨南大学药学院)
王冰副教授(上海中医药大学)
袁子民副教授(辽宁中医药大学)
张华副教授(山东中医药大学)

获奖的优秀审稿专家是在 2014—2016 年度一贯积极支持编辑部工作,能认真负责、按时完成审稿任务,且审稿数量较多的专家,由责任编辑推荐,编委会年会通过并颁发了获奖证书及奖金。